

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 89106463.6

Int. Cl.⁵ **C12P 21/00 , C12N 15/00 ,
C12N 5/00 , A61K 39/104 ,
G01N 33/577**

Anmeldetag: 12.04.89

Priorität: 19.04.88 DE 3813023

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 28.03.90 Patentblatt 90/13

Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

Erfinder: **Domdey, Horst, Dr.**
Fasanenweg 6
D-8027 Neuried(DE)
Erfinder: **Marget, Matthias**
Olgastrasse 12
D-8000 München 19(DE)
Erfinder: **von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.**
Am Waldweg
D-8193 Ambach(DE)

Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al**
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

Monoklonaler Antikörper gegen Pseudomonas aeruginosa, seine Herstellung und Verwendung.

Ein monoklonaler Antikörper (mAK) wird beschrieben, der mit allen bisher bekannten 19 Pseudomonas aeruginosa-Serotypen kreuzreagiert. Die Sequenz der variablen Regionen ist angegeben. Dieser mAK kann als Diagnostikum, als Wirkstoff oder als Wirkstoffträger eingesetzt werden.

EP 0 338 395 A3



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
P,X	GENE, Band 74, Dezember 1988, Seiten 335-345, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); M. MARGET et al.: "Cloning and characterization of cDNAs coding for the heavy and light chains of a monoclonal antibody specific for Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein I" * Insgesamt * ---	1-13	C 12 P 21/00 C 12 N 15/00 C 12 N 5/00 A 61 K 39/104 G 01 N 33/577
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 110, Nr. 13, 27. März 1989, Zusammenfassung Nr. 109427k, Columbus, Ohio, US; & JP-A-63 152 984 (WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25-06-1988 * Zusammenfassung * ---	1-13	
P,Y	EP-A-0 270 077 (SUMITOMO CHEMICAL CO.) ---	1-13	
Y	INFECTION AND IMMUNITY, Band 42, Nr. 3, Dezember 1983, Seiten 1027-1033, American Society for Microbiology; L.M. MUTHARIA et al.: "Surface localization of Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies" * Seite 1027, "Zusammenfassung" * ---	1-13	
A	EP-A-0 256 713 (MERCK) -----		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 21-12-1989	Prüfer TURMO Y BLANCO C.E.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 338 395 B1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: **28.12.94**(51) Int. Cl.⁵: **C12P 21/08, C12N 15/13,
C12N 5/12, A61K 39/104,
G01N 33/577**(21) Anmeldenummer: **89106463.6**(22) Anmeldetag: **12.04.89**(54) **Monoklonaler Antikörper gegen Pseudomonas aeruginosa, seine Herstellung und Verwendung.**(30) Priorität: **19.04.88 DE 3813023**(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
28.12.94 Patentblatt 94/52(64) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE(56) Entgegenhaltungen:
**EP-A- 0 256 713
EP-A- 0 270 077**

GENE, Band 74, Dezember 1988, Seiten
335-345, Elsevier Science Publishers
B.V.(Biomedical Division); M. MARGET et al.:
"Cloning and characterization of cDNAs coding
for the heavy and light chains of a
monoclonal antibody specific for Pseudo-
monas aeruginosa outer membrane protein
I"

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 110, Nr. 13, 27.

März 1989, Zusammenfassung Nr.109427k,
Columbus, Ohio, US;

INFECTION AND IMMUNITY, Band 42, Nr. 3,
Dezember 1983, Seiten 1027-1033, American
Society for Microbiology; L.M. MUTHARIA et
al.: "Surface localization of Pseudomonas ae-
ruginosa outer membrane porin protein F by
using monoclonal antibodies"

(73) Patentinhaber: **BEHRINGWERKE Aktiengesell-
schaft**
Postfach 1140
D-35001 Marburg (DE)

(72) Erfinder: **Domdey, Horst, Dr.**
Fasanenweg 6
D-8027 Neuried (DE)
Erfinder: **Marget, Matthias**
Olgastrasse 12
D-8000 München 19 (DE)
Erfinder: **von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.**
Am Waldweg
D-8193 Ambach (DE)

EP 0 338 395 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper (mAK), der mit allen bisher bekannten 19 *Pseudomonas aeruginosa*-Serotypen kreuzreagiert. Dieser Antikörper kann als Diagnostikum, als Wirkstoff
5 oder als Wirkstoffträger eingesetzt werden.

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistisches, gramnegatives, pathogenes Bakterium. Es kann lebensbedrohliche Krankheiten verursachen, z. B. Pneumonie bei Patienten mit zystischer Fibrose oder Septikämie bei Patienten mit Brandverletzungen bzw. Knochen- oder Harnwegsinfektionen. Die Therapie von durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachten Erkrankungen mittels Antibiotika ist durch sein Resistenz-
10 muster schwierig und oft erfolglos. Deshalb richtete sich die Aufmerksamkeit bei der Infektionsbekämpfung auf Immunprophylaxe und Immuntherapie. Im Rahmen von Studien zur Antigenität von *Pseudomonas aeruginosa* wurden monoklonale Antikörper gegen das äußere Membranprotein F hergestellt. Diese mAK reagierten mit den 17 untersuchten Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* sowie mit Isolaten von Patienten mit zystischer Fibrose (L. M. Mutharia et al. (1983) *Infection and Immunity*, Vol. 42, No. 3, 1027-
15 1033). Gemäß späteren Untersuchungen ergab Schutz gegen alle 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* eine Mischung von gereinigten äußeren Membranproteinen (OMP) F, H2 und I (von Specht et al. (1987) *Infection* 15, 408-412). Bei dieser Untersuchung wurden aus immunisierten Mäusen Lymphozyten isoliert und in bekannter Weise mit NS-1 Myelomzellen (Kearny et al. (1979), *J. Immunology*, 123, 4, 1548-1550) fusioniert. Aus etwa 500 erhaltenen Hybridomen wurde ein mAK - im folgenden mAK 6A4 bezeichnet
20 - ausgewählt, der die nachfolgend aufgezählten vorteilhaften Eigenschaften besitzt:

- starke und einheitliche Reaktion mit allen 19 *Pseudomonas aeruginosa* Serotypen
- positiver C1q Bindungstest
- schützend bei Belastungsinfektion von Mäusen mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Zusätzlich wurde die cDNA bestimmt (siehe Beispiele, Tab. 1 und Tab. 2). Ein humaner mAK kann nun
25 erhalten werden, indem die konstanten Genbereiche des Mausantikörpers durch die entsprechenden humanen Sequenzen ersetzt werden. Die Expression dieser "humanisierten" Antikörpersequenz in eukaryotischen Zellen, zum Beispiel CHO-Zellen oder Hefen, liefert den entsprechenden humanen mAK, der für diagnostische Zwecke, für Prophylaxe und Therapie eingesetzt werden kann.

Die Erfindung betrifft folglich

- a) gereinigte und isolierte DNA-Sequenzen, die für mAK 6A4 kodieren oder Teile davon, einschließlich ihrer Transkriptionsprodukte, sowie die entsprechende Kombination der "humanisierten" Sequenzen,
- b) diese Sequenzen ganz oder teilweise enthaltende DNA-Strukturen und Vektoren,
- c) mit solcher DNA transformierte pro- oder eukaryotische Zellen,
- d) die von diesen Zellen aufgrund der Transformation exprimierten Polypeptide oder Teile davon,
- 35 e) deren Aminosäuresequenzen,
- f) Diagnostika, Prophylaktika oder Therapeutika, die Peptide oder Aminosäuresequenzen von (e) alleine oder in Kombination enthalten,
- g) ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung der unter (d) genannten Polypeptide oder Teilen davon,
- h) sowie das Epitop, an das Antikörper kodiert von Sequenzen unter (a) binden.

40 Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen, Tabellen und den Patentansprüchen aufgeführt.

Beispiel 1: Herstellung des mAK 6A4

- 45 1a) Reinigung der zur Immunisierung zu verwendenden äußeren Membranproteine OMP F, H2 und I von *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12
OMP F, H2 und I wurden wie von T. Mizuno und M. Kageyama in *J. Biochem.* 84, 179-258 (1978) beschrieben aus *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12 gereinigt. Demgemäß wurden die Zellen in der späten Log-Phase geerntet, durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen und die Zellmembranen durch
50 einstündige Zentrifugation bei 100 000 g gesammelt. Die Zellmembranen wurden schrittweise mit 2% SDS, 10% Glycerin und 2% SDS und schließlich 0.1 M NaCl extrahiert. Die übriggebliebene unlösliche Fraktion enthält hauptsächlich OMP F, OMP H2 und etwas OMP I.
- 1b) Immunisierung von Balb/c Mäusen mit OMP F, H2 und I
Zur Immunisierung erhielt jede Maus 50 µg gereinigte OMP's (80 µl) in einer Suspension mit 20 µg Al-
55 (OH)₃ i.p. an Tag 1, was mit derselben Dosis an Tag 14 und Tag 21 wiederholt wurde. Nach weiteren 4 Wochen wurde nochmals geboostert (gleiche Dosis) und nach anschließend 3 Tagen die Milzen entnommen.

1c) Zelfusion

Bei der Zelfusion wurde im wesentlichen nach der Methode von G. Köhler und C. Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511 - 519 (1976) vorgegangen. Etwa 1×10^8 Milzzellen präpariert aus den entnommenen Milzen von (1b) wurden mit 5×10^7 NS-1 Myelomzellen (Kearny et al., a.a.O., kommerziell erhältlich von der American Type Culture Collection über ATCC Nr. TIB 18) in 2ml 50% Polyethylenglycol 1500 (Serva, Heidelberg) fusioniert. Nach der Fusion wurden die Zellen mit 1×10^6 /ml normalen Milzzellen in Dulbeccos modifiziertem Minimalmedium (MEM) ausplattiert, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält. Antikörper-Produktion wurde durch den nachfolgend beschriebenen Enzyme-linked-Immuno-sorbent Assay (ELISA) geprüft und Klone von Interesse wurden durch Ausverdünnen gewonnen.

1d) ELISA zum Nachweis von Antikörper-sezernierenden Klonen

Mit Hilfe eines direkten ELISA's wurde bestimmt, ob und in welchem Umfang die verschiedenen mAK an das Antigen binden.

Mikrotiterplatten der Firma Dynatech, Plochingen, aus Polyvinylchlorid, mit 96 Vertiefungen, wurden mit 100µl *Pseudomonas aeruginosa* Sonikat (s.u., 1 : 200 verdünnt mit PBS = 4,5µg/ml) des Serotyps 12 beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal gewaschen und 1 Stunde bei 37 °C mit in PBS verdünntem bovinem Serumalbumin abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden die Vertiefungen mit Folie abgedeckt und die Platten bis zur Verwendung bei minus 20 °C aufbewahrt.

Für jeden zu testenden Klon wurden (von einer logarithmischen Verdünnungsreihe 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16,...) jeweils 50µl Ascites (als Doppelproben) einpipettiert.

Als positive Kontrolle diente polyklonales Mausserum von mit den Membranproteinen aktiv immunisierten und 4-fach geboosterten Mäusen (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000). Als negatives Kontrollserum wurde das Serum nicht immunisierter Mäuse verwendet.

Als Verdünnungsmedium diente PBS (phosphate buffered saline). Nach einstündiger Inkubation der Platte bei 37 °C und dreimaligem Waschen wurden 50µl Peroxydase konjugiertes Anti-Maus-F(ab)₂ in der Verdünnung 1 : 500 zugegeben.

Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37 °C und dreimaligem Waschen wurden 50µl des Substrats o-Phenylendiamin (0,2% OPD, 0,015 % H₂O₂) zugegeben. Alle ELISA-Reagenzien stammten aus dem NEI-501 Kit der Fa. NEN New England Nuclear, Dreieich.

Nach weiterem dreißigminütigem Inkubieren wurde die Reaktion mit 50µl 4,5M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450nm mit einem ELISA-Auswertgerät MR 580 der Firma Dynatech bestimmt. Positive Klone zeigten eine Extinktion $\geq 0,2$ OD.

Aus 7 Klonen der engeren Wahl wurde der Klon, der mAK 6A4 sekretiert, für die anschließenden Untersuchungen ausgewählt, weil mAK 6A4 die auf S. 2 geschilderten Vorteile besitzt und zusätzlich stark sekretiert wird (etwa 1% der gamma-Globulin-Fraktion in Ascites-Flüssigkeit besteht aus mAK 6A4). mAK 6A4 gehört zur IgG2a Klasse und reagiert mit OMP I.

Sonikatherstellung:

Die Bakterien des Serotyps 0-12 wurden in Trypticase-Soy-Boullion angezüchtet. Dann wurden sie 3x gewaschen und in Natrium-Chlorid-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 3 x 5 Minuten (mit je 2 Minuten Abstand) beschallt.

Nach erneutem Zentrifugieren (1x mit 5000 U/Min./10 Minuten) wurde der Überstand portioniert und bis zur Verwendung bei minus 20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug bei den beschichteten Platten 4,5µg / Vertiefung.

45 Beispiel 2: Isolierung und Sequenzierung der für die variablen Bereiche kodierenden cDNA von mAK 6A4

2a) cDNA Isolierung

6A4-Hybridomzellen wurden aus Ascites-Flüssigkeit durch Zentrifugation (10 Min. bei 1500 g und 4 °C) abgetrennt. Daraus wurde nach H. Domdey et al., Cell 39, 611-621 (1984) die Poly (A)⁺ RNA gewonnen. cDNA wurde ausgehend von 15µg Poly (A)⁺ RNA mit einem kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese Kit (Fa. Amersham) synthetisiert. Die doppelsträngige, glattendige cDNA wurde mittels des von Fa. NEN New England Nuclear erhältlichen Klonierungs-Kits mit einzelsträngigen Oligo-dC-Enden versehen und mit entsprechend Oligo-dG-endigem Plasmid pBR322 annelliert. Nach Transformation (Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580) von kompetenten E.coli K12 Stamm JM 109 Zellen (Yanisch - Perron C. et al., (1985) Gene 33, 103-119) wurden etwa 12 000 Transformanten erhalten, die mit ³²P-endmarkiertem Oligonukleotid 5'-CAGGCATCCTAGAGTCAC-3' (I) zum Nachweis von Klonen, die cDNA der schweren Kette von Subgruppe II B enthalten, hybridisiert wurden. Ebenso wurde das mit ³²P-Deoxynukleotidtriphosphaten "nicktranslatierte" 2 850 Basenpaare (bp) große Hind III-Bam HI Fragment (II) des

Plasmids C1 (W.O. Weischert et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10, 3627-3645) zur Hybridisierung verwendet. (I) stammt aus der Region des IgG2a^a-Allels in der Maus (Schwere Kette). (II) kodiert für die Kappa- konstante Region (Leichte Kette). Die Hybridisierungen wurden wie bei D. Woods, Focus 6, 1-2 (1984) beschrieben durchgeführt. Etwa 4.2% bzw. 1.6% der Kolonien reagierten positiv mit den kappa- bzw. gamma-spezifischen Sonden.

2b) cDNA-Sequenzierung

Aus den oben gewonnenen Plasmid-enthaltenden Kolonien wurden solche ausgesucht, die vermutlich komplette cDNA's der leichten bzw. schweren Kette enthielten. Die Insert-DNA der Plasmide pUL5 (enthaltend die cDNA der leichten Kette) und p BH7 (enthaltend die cDNA der schweren Kette) wurden nach Standardmethode sequenziert (F. Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 5463-5467), modifiziert wie beschrieben durch E.Y. Chen und P. Seeburg, DNA 4, 165-170 (1985). Die Nukleotidsequenzen der jeweiligen variablen Regionen sind in Tab. 1 (leichte Kette) und Tab. 2 (schwere Kette) angegeben. Für die konstanten Regionen sind die jeweiligen Nukleotidsequenzen - nicht mehr in den Tabellen angegeben - identisch mit den aus der Literatur bekannten (gamma-Kette: Schreier et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 4495-4499; Kappa-Kette: P.H. Hamlyn et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 4485-4494). Die Gesamtlänge der kodierenden Regionen beträgt für die leichte Kette 717 bp und für die schwere Kette 1407 bp, wobei die ersten 20 Aminosäuren der leichten Kette das "Leader-Peptid" darstellen, so daß die reife leichte Kette 259 Aminosäuren lang ist. Die schwere Kette besitzt ein "Leader-Peptid" von 19 Aminosäuren, demzufolge das reife Molekül 450 Aminosäuren lang ist.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

-96	ctgcaggggggggggacacagggcagctgggagcagatggattcacaggcccgaggttctt	-60
	MetAspSerGlnAlaGlnValLeu	-20
-36	atattgctgctgctatgggtatcttggtacgtctggggacatttgtgatgtcacaggtctcca	
-12	ileleuleuleuleutrpvalserglythrCysGlyasp ¹ illevalMetSerGlnSerPro	
96	tcctccctggctgtgtcagcagagagagggtcacactatgagctgcgaatccaggtcagagct	
9	SerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluLysValThrMetSerCysLysSerSerGlnSer	
156	ctgctcaacagatataacccggaagaacttctttggcttggtaccagcagaaaccagggcag	
29	LeuLeuasnSerIleThrArgLysasnPheLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGln	
216	tctcctaaaactgctgatctactgggcattccactaggggaatctggggctccctgatcgcttc	
49	SerProLysLeuLeuIleTyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProaspArgphe	
276	acaggcagtggaatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgtgcaggctgaaagac	
69	ThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAlaGluasp	
336	ctggcagtttattactgcaagcaatcttataatcttccgacggtccggtggaggccaccaaag	
89	LeuAlaValTyrTyrCysLysGlnSerTyrAsnLeuArgThrPheGlyGlyGlyThrLys	
396	ctggaaatcaaacgggctgatgctgcaccactgtatccatcttcccaccatocagtgag	
109	LeuGluIleLysArgAlaaspAlaAlaProThrValSerIlePheProProSerSerGlu	113

3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die konstante Region oder Teile davon humanen Ursprungs sind.
4. Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 sezerniert.
5. Ein Expressionssystem, das einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 exprimiert.
6. Epitop, dadurch gekennzeichnet, daß der monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 daran bindet.
7. Verfahren zur Herstellung eines Hybridoms nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit den äußeren Membranproteinen von *Pseudomonas aeruginosa* immunisiert wird, Milzzellen aus einem solchen Tier entnommen, mit Myelomzellen, vorzugsweise NS-1-Zellen fusioniert und die resultierenden Hybridome auf Sezernierung von mAK gegen OMP-I von *Pseudomonas aeruginosa* selektioniert werden.
8. DNA-Sequenzen, kodierend für die in dem monoklonalen Antikörper gemäß Anspruch 1 enthaltenen Aminosäuresequenzen gemäß Tabelle 1 und Tabelle 2 und der gegebenenfalls in diesem Antikörper enthaltenen Teile, Allele und Mutanten dieser Aminosäuresequenzen.

20 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers, (mAK) dadurch gekennzeichnet, daß die für die variablen Antikörper-Regionen gemäß Tabelle 1 und 2 kodierenden DNA-Sequenzen oder Teile, Allele und Mutanten der variablen Antikörperregionen, soweit diese Teile, Allele und Mutanten Reaktivität mit allen bekannten 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* besitzen und mit dem äußeren Membranprotein I (OMP I) von *Pseudomonas aeruginosa* reagieren, in ein geeignetes Antikörper-Gerüst integriert und in geeigneten Expressionssystemen exprimiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon murinen Ursprungs sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon humanen Ursprungs sind.
4. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1, 2 oder 3 erzeugte mAK eingesetzt werden.
5. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß pharmazeutische Wirkstoffe an einen nach Anspruch 1, 2 oder 3 hergestellten mAK gebunden werden.
6. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1, 2 oder 3 hergestellte mAK mit pharmakologisch üblichen Zusätzen gemischt werden.

Claims

45 Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A monoclonal antibody (mAb), wherein the variable regions contain the amino acid sequences of Table 1 and Table 2 or parts thereof, including the alleles and mutants, as long as these parts, alleles and mutants possess reactivity with all 19 known serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and react with outer membrane protein I (OMP I) of *Pseudomonas aeruginosa*.
2. A monoclonal antibody as claimed in claim 1, wherein the constant regions or parts thereof are of murine origin and preferably correspond to IgG2A.
3. A monoclonal antibody as claimed in claim 1, wherein the constant regions or parts thereof are of human origin.
4. A hybridoma which secretes a monoclonal antibody as claimed in claim 1.

5. An expression system which expresses a monoclonal antibody as claimed in claim 1.
6. An epitope to which a monoclonal antibody as claimed in claim 1 binds.
7. A process for the preparation of a hybridoma as claimed in claim 4, which comprises a mammal being immunized with the outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, spleen cells being taken from such an animal and fused with myeloma cells, preferably NS-1 cells, and the resulting hybridomas being selected for secretion of mAbs against OMP-I of *Pseudomonas aeruginosa*.
8. DNA sequences coding for the amino acid sequences which are shown in Table 1 and Table 2 and are contained in the monoclonal antibody as claimed in claim 1, and for the parts, alleles and mutants, which may be present in said antibody, of these amino acid sequences.

Claims for the following Contracting States : ES, GR

1. A process for the preparation of a monoclonal antibody (mAb), which comprises the DNA sequences coding for the variable antibody regions shown in Table 1 and 2, or parts, alleles and mutants of the variable antibody regions, as long as these parts, alleles and mutants possess reactivity with all 19 known serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and react with outer membrane protein I (OMPI) of *Pseudomonas aeruginosa*, being integrated in a suitable antibody framework and expressed in suitable expression systems.
2. The process as claimed in claim 1, wherein the constant regions or parts thereof are of murine origin.
3. The process as claimed in claim 2, wherein the constant regions or parts thereof are of human origin.
4. A process for the production of diagnostic aids, which comprises using mAbs produced as claimed in claim 1, 2 or 3.
5. A process for the production of pharmaceuticals, which comprises linking pharmaceutical active substances to an mAb prepared as claimed in claim 1, 2 or 3.
6. A process for the production of pharmaceuticals, which comprises mixing mAbs prepared as claimed in claim 1, 2 or 3 with pharmacologically customary additives.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Anticorps monoclonal (AcM), caractérisé en ce que les régions variables contiennent les séquences d'acides aminés du tableau 1 et du tableau 2 ou des parties de celles-ci, y compris des allèles et mutants, dans la mesure où ces parties, allèles et mutants possèdent une réactivité avec tous les 19 sérotypes connus de *Pseudomonas aeruginosa* et réagissent avec la protéine de membrane externe I (OMP I) de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Anticorps monoclonal selon la revendication 1, caractérisé en ce que la région constante ou des parties de celle-ci sont d'origine murine et correspondent de préférence à IgG 2A.
3. Anticorps monoclonal selon la revendication 1, caractérisé en ce que la région constante ou les parties de celle-ci sont d'origine humaine.
4. Hybridome sécrétant un anticorps monoclonal selon la revendication 1.
5. Système d'expression exprimant un anticorps monoclonal selon la revendication 1.
6. Epitope, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal selon la revendication 1 se lie à celui-ci.
7. Procédé pour la production d'un hybridome selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on immunise un mammifère avec les protéines de membrane externes de *Pseudomonas aeruginosa*, on

prélève des cellules spléniques d'un tel animal, on les fait fusionner avec des cellules de myélome, de préférence des cellules NS-1, et on sélectionne les hybridomes résultants sur la base de la sécrétion d'AcM dirigés contre OMP-I de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 5 8. Séquences d'ADN codant pour les séquences d'acides aminés selon le tableau 1 et le tableau 2, contenues dans l'anticorps monoclonal selon la revendication 1, et les parties, allèles et mutants de ces séquences d'acides aminés, éventuellement contenus dans cet anticorps.

Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, GR

10

1. Procédé pour la production d'un anticorps monoclonal (AcM), caractérisé en ce que les séquences d'ADN codant pour les régions variables de l'anticorps selon les tableaux 1 et 2 ou des parties, allèles et mutants des régions variables de l'anticorps, dans la mesure où ces parties, allèles et mutants possèdent une réactivité avec tous les 19 sérotypes connus de *Pseudomonas aeruginosa* et réagissent avec la protéine de membrane externe I (OMP I) de *Pseudomonas aeruginosa*, sont intégrées dans un squelette d'anticorps approprié et exprimées dans des systèmes d'expression appropriés.

15

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les régions constantes ou les parties de celles-ci sont d'origine murine.

20

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les régions constantes ou les parties de celles-ci sont d'origine humaine.

4. Procédé pour la production d'agents de diagnostic, caractérisé en ce que l'on utilise des AcM produits selon la revendication 1, 2 ou 3.

25

5. Procédé pour la fabrication de médicaments, caractérisé en ce que des substances actives pharmaceutiques sont liées à un AcM produit selon la revendication 1, 2 ou 3.

6. Procédé pour la fabrication de médicaments, caractérisé en ce que l'on mélange des AcM, produits selon la revendication 1, 2 ou 3, avec des additifs pharmacologiquement usuels.

30

35

40

45

50

55